



TITLE:

Studies on Electron Transfer Pathway and Characterization of Direct Electron Transfer-Type Bioelectrocatalysis of Fructose Dehydrogenase( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Kawai, Shota

---

CITATION:

Kawai, Shota. Studies on Electron Transfer Pathway and Characterization of Direct Electron Transfer-Type Bioelectrocatalysis of Fructose Dehydrogenase. 京都大学, 2015, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19022>

RIGHT:

( 続紙 1 )

京都大学	博士（農学）	氏名	河井 翔太
論文題目	Studies on Electron Transfer Pathway and Characterization of Direct Electron Transfer-Type Bioelectrocatalysis of Fructose Dehydrogenase （フルクトース脱水素酵素による直接電子移動型酵素電極反応の電子移動経路とその特性評価）		
(論文内容の要旨)			
<p>生体内における電子移動反応触媒としての酸化還元酵素の中には、電極を電子供与体あるいは受容体とできるものがある。このように酸化還元酵素触媒反応と電極反応を直接組み合わせた反応系を直接電子移動（direct electron transfer; DET）型酵素機能電極反応系と呼び、様々なバイオ電気化学デバイスの構築に応用できることが期待されている。このため、DET反応系は世界的にも多くの注目を集めている。DET反応は酵素のコファクターが電極と電子授受することで進行する。しかし、通常コファクターは絶縁体であるタンパク質内部に存在しているため、一般的には電極との反応性は必ずしも高くなく、DET反応が可能な酵素（DET型酵素）の報告例も少ない。</p> <p>一方、DET型酵素のひとつに<i>Gluconobacter japonicus</i>由来のフルクトース脱水素酵素（FDH）がある。FDHは、フルクトースの酸化反応を触媒するヘテロトリマー（FdhS、FdhC、FdhL）構造の膜結合酵素であり、基質特異性が高い。また、DET型酵素の中でも電極との反応性が極めて高い。このためフルクトースセンサの開発やバイオ電池への展開に期待が高まっている。そこで本研究では、DET反応の一般特性を解明する手がかりとして、このFDHのDET反応特性を明らかにすることを目的とし、FDHの発現系を構築するとともに、精製酵素の電気化学的特性を評価し、電極反応経路の解明を目指した。</p> <p>第1章では、FDHをコードする遺伝子配列を決定し、<i>G. oxydans</i>での発現系の構築を試みた。その過程で、FdhSの開始コドンがTTGである可能性が示唆されたため、TTGのままのもの（TTGFDH）とこれをATGに改変したもの（ATGFDH）のそれぞれの発現系を構築した。膜画分における比活性を比較した結果、野生型に対してTTGFDHでは約20倍、ATGFDHでは約100倍のFDHを発現できる大量生産系の構築に成功した。また、FDHのアミノ酸配列より、FdhC内にヘムC 結合モチーフが3つ、FdhL内にフラビン結合モチーフが1つ存在することが予想され、この点を精製酵素を用いて分光学的にも確認した。</p> <p>第2章では、タンパク質工学的にヘム含有サブユニットであるFdhCを欠損させた変異体FdhSLの発現系を構築し、FDHとFdhSLの電気化学的特性を比較評価した。FdhSLは、フルクトース酸化活性は保有していたが、DET反応活性を喪失していたことから、FDHのDET反応にはヘムCが関与していると考えた。そこで、電極への最終電子供与部位を特定するため、FDHが有する3つのヘムCの酸化還元電位を、無隔膜間接的電解分光法を用いて分離評価した。各ヘムCの式量電位はMacIlvaine緩衝液（pH 5.0）において、<math>-10 \pm 4</math>、<math>60 \pm 8</math> ならびに <math>150 \pm 4</math> mV (vs. Ag AgCl sat. KCl) と評価した。電流－電圧曲線の特性との比較から、酵素電極反応の触媒サイクル時には、3つ</p>			

のうち2つのヘムCのみが関与しているという反応経路を提言した。

第3章では、FdhCのみの単独発現系を構築し、第2章で構築したFdhSLを用いた*in vitro*条件下でのFDHの再構築を試みた。電気化学測定によりFdhCに由来する電子移動シグナルを観測することはできなかった。一方、*in vitro*条件下でFdhCとFdhSLを混合すると、化学量論的にFdhSL:FdhC = 1:1で非常に強く結合することを明らかにした。また、FdhSLとFdhCの結合によりDET反応活性が復元することを確認した。これにより、FDHのDET反応における電極反応部位がヘムCであることを証明した。

第4章では、Au電極上に自己組織化単分子膜を形成させ、親水的または疎水的雰囲気電極表面を構築し、その修飾電極上でのFDHのDET反応挙動を調べた。低濃度の界面活性剤存在下では、親水的・疎水的両電極においても、FDHを触媒とするフルクトース酸化電流が観測された。その状態で、臨界ミセル濃度（CMC）以上となるように界面活性剤を添加した結果、疎水的電極ではDET反応が観測できなくなったのに対し、親水的電極では添加前と比べ約2割程度の電流値の減少にとどまり、触媒電流を長時間にわたって安定に観測できた。同様に、測定溶液内にCMC以上の界面活性剤が存在する条件下でのFDHのDET反応を測定した結果、親水的電極でのみ触媒電流が観測できた。一方、両電極への界面活性剤及びFDHの吸着挙動を観察するために水晶発振子マイクロバランス測定を行った。その結果、CMC以上の界面活性剤存在下でも、FDHは両修飾電極にほぼ単分子膜吸着できることを明らかにした。こうした実験結果をすべて満足する吸着・相互作用モデルとして、親水的電極上では界面活性剤の二分子膜が形成され、そこにFDHが埋まりDET反応活性を示し、疎水的電極上では電極と界面活性剤が強く相互作用し、高濃度界面活性剤存在下では、電極表面に界面活性剤が単分子膜を形成し、FDHによるDET反応を阻害すると考えた。また、膜結合タンパク質のように界面活性剤の共存が必須の場合でも、親水的な電極を用いると、界面活性剤と電極との弱い相互作用で、DET反応に支障がでない吸着様式で酵素を安定保持し、DET反応させることができることを示した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

酸化還元酵素と電極が直接電子の授受を行う反応を直接電子移動 (DET) 型酵素機能電極反応と呼び、バイオ電池やバイオセンサなどへの応用展開が期待されている。DET反応において電極と電子授受しているのは酵素のコファクターである。しかしながら、コファクターは絶縁体であるペプチドに囲まれている場合が多く、必ずしも電極と反応できるとは限らない。そのため、DET反応できる酵素 (DET型酵素) の報告例は少ない。一方、DET型酵素のひとつであるフルクトース脱水素酵素 (FDH) はDET反応活性が極めて高いという稀有な特徴を有しており、そのバイオデバイスへの展開に期待が高まっている。DET反応の一般特性を解明する手がかりとして、このFDHのDET反応活性の特性評価は非常に重要であると考えられる。

そのような背景のもと、本論文ではFDHの電極反応経路を特定することに焦点をあて、FDHの特性をタンパク質工学的、電気化学的、分析化学的に解析し、DET反応における一連の電子移動経路を特定した。また、FDHのDET反応を阻害する可能性のある中性界面活性剤がDET反応に与える影響を調べ、それらの吸着・相互作用モデルを提唱した。本論文で評価できる点は以下の通りである。

1. ヘテロトリマー構造 (FdhS、FdhC、FdhL) を有するFDHの *G. oxydans* を用いた大量生産系の構築、及びその精製に成功した。FDHのアミノ酸配列からFdhLにFAD、FdhCに3つのヘムCをコファクターとして有していることを明らかにし、それを分光学的に確認した。
2. FdhCサブユニットを欠損したFdhSL、及びFdhCについても大量生産系を構築した。それぞれの精製酵素を用いて電気化学的特性を評価し、FDHのDET反応における電極反応部位がヘムCであることを明らかにした。
3. 無隔膜間接的電解分光法を用いてFdhC内の3つのヘムCの式量電位をそれぞれ算出し、DET反応におけるフルクトースから電極への一連の電子移動経路を解明した。
4. 電極表面を親水的または疎水的条件に制御し、界面活性剤及びFDHの電極への吸着とその際のDET反応活性の変化から、電極表面での界面活性剤とFDHの相互作用に関するモデルを提唱した。

以上のように、本論文はDET型酵素であるFDHのDET反応を多面的に解析し、DET反応の電子移動経路を特定した。本研究はFDHを利用したバイオデバイスの開発のみならず、新規有用酵素の探索やDET型酵素の改良を行う際の指針となりえるものであり、生物電気化学、酵素化学、分析化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成27年2月5日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)